

I HEREBY CERTIFY THAT THIS CORRESPONDENCE IS BEING DEPOSITED WITH THE UNITED STATES POSTAL SERVICE AS FIRST CLASS MAIL IN AN ENVELOPE ADDRESSED TO: COMMISSIONER FOR PATENTS, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313-1450, ON THE DATE INDICATED BELOW.



BY: Sheryl Neumann Date: February 10, 2004

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Re Patent Application of: :
Osamu NOZAKI et al. :
: Conf. No.: 5372 : Group Art Unit: 3736
: Appln. No.: 10/649,471 : Examiner: Not Yet Assigned
: Filing Date: August 27, 2003 : Attorney Docket No.: 9948-6US (PAA-268)
: Title: METHOD AND DEVICE FOR DETERMINATION OF HYDROGEN
PEROXIDE IN BODY FLUID

**CLAIM OF FOREIGN PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT**

Applicants hereby claim the right of foreign priority under 35 U.S.C. Section 119 for the above-identified patent application. The claim of foreign priority is based upon Application No. 2002-248766, filed in Japan on August 28, 2002, and the benefit of that date is claimed.

Submitted herewith is a certified copy of Japanese Application No. 2002-248766. It is submitted that this document completes the requirements of 35 U.S.C. Section 119, and benefit of the foreign priority is respectfully requested.

Respectfully submitted,

Osamu NOZAKI et al.

February 11, 2004 By: William W. Schwarze
(Date)

WILLIAM W. SCHWARZE

Registration No. 25,918

AKIN GUMP STRAUSS HAUER & FELD LLP

One Commerce Square

2005 Market Street, Suite 2200

Philadelphia, PA 19103-7013

Telephone: 215-965-1200

Direct Dial: 215-965-1270

Facsimile: 215-965-1210

E-Mail: wschwarze@akingump.com

WWS:srn
Enclosures

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 8月28日
Date of Application:

出願番号 特願2002-248766
Application Number:

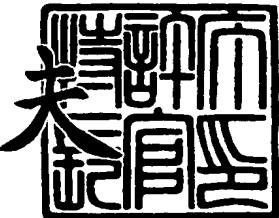
[ST. 10/C] : [JP2002-248766]

出願人 野崎 修
Applicant(s): 河本 裕子
株式会社ケムコ

2003年 9月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康



出証番号 出証特2003-3074315

【書類名】 特許願

【整理番号】 P020205-02

【提出日】 平成14年 8月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪狭山市大野台1丁目29の4

【氏名】 野崎 修

【発明者】

【住所又は居所】 島根県米子市錦町1丁目209-3

【氏名】 河本 裕子

【特許出願人】

【住所又は居所】 大阪府大阪狭山市大野台1丁目29の4

【氏名又は名称】 野崎 修

【特許出願人】

【住所又は居所】 島根県米子市錦町1丁目209-3

【氏名又は名称】 河本 裕子

【特許出願人】

【識別番号】 396021896

【氏名又は名称】 株式会社ケムコ

【代理人】

【識別番号】 100072213

【弁理士】

【氏名又は名称】 辻本 一義

【電話番号】 06-6766-6111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008958

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 体液中の過酸化水素測定法および過酸化水素測定装置

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルカリ環境下で固定化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼと過酸化水素とイミダゾール類との反応により生ずる化学発光強度を測定することを特徴とする体液中の過酸化水素測定法。

【請求項2】 移動相流路へ体液を注入し、別の移動相流路よりイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液を注入して、これらの液をフローセル中のホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ固定化固相の充填部位で混合させて化学発光させ、その発光強度を化学発光測定システムにより測定することを特徴とする体液中の過酸化水素測定法。

【請求項3】 クロマトグラフィー用ポンプ（11）、オートサンプラー（12）を設けた体液の移動相流路（F1）と、クロマトグラフィー用ポンプ（21）を設けたイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液の移動相流路（F2）を合流させ、これら移動相流路の合流路（F3）をホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ固定化固相を充填したフローセル付き化学発光検出器（31）に接続し、さらにこの化学発光検出器（31）のフローセル（32）の前面に近接して、化学発光検出器（31）の光電子増倍管（33）を設置したことを特徴とする体液中の過酸化水素装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、新規な化学発光法を用いた体液中の過酸化水素測定法および過酸化水素測定装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来から臨床検査の分野において、体液中の過酸化水素を測定することは、酸化ストレス、オキシダーゼ酵素の基質物質の測定（例えば、グルコース、コレステロールなどの測定）に必要である。

【0003】

過酸化水素の化学発光測定は、その簡便、迅速、高感度などの点から、臨床検査には適している。過酸化水素の化学発光測定法に通常用いられる化学発光物質には、ルミノール、イソルミノール、ロフィン、ルシゲニン、過シュウ酸エステルなどがある。

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

しかしながら、従来の過酸化水素の化学発光測定法や測定装置では、過酸化水素を含む化学発光試薬の迅速で効率の良い自動混合ができない、光電子倍増管などの光電子検出器に近接した位置で化学発光反応の開始および検出ができないなどの点で、測定精度の再現性の不良、有機溶媒の廃液の問題、検出感度の低下などにおける不利、不便であるという課題を有していた。

【0005】

また、従来の過酸化水素の化学発光測定法に用いられる化学発光物質は、その化学発光検出に必須である水に比較的難溶性であったり、不純物の混入があったり、調整試薬が保存中に劣化するなどの点で、不利、不便であるという課題を有していた。

【0006】

さらに、個別の化学発光物質の問題点として、ルミノールおよび過シュウ酸エステルでは、高濃度溶液調整にアセトニトリルなどの有機溶媒による溶解が必要であるという課題を有していた。ルシゲニンはその発光持続時間が短く、バックグラウンドノイズが多いという課題を有していた。また、ロフィン化学発光では、水難溶性と共にその発光収率が良くないという課題を有していた。

【0007】

そこで、この発明は、上記従来の過酸化水素の化学発光測定法や測定装置、またはその化学発光測定法に用いられる化学発光物質が有する課題を解決するためになされたものであり、フローセルを用いた過酸化水素の化学発光測定法において、従来からの化学発光物質を必要としない新規な定量性のある化学発光系を見いだし、この発明の過酸化水素測定法および過酸化水素測定装置に至ったものであ

る。

【0008】

【課題を解決するための手段】

この発明の体液中の過酸化水素測定法は、アルカリ環境下で固定化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼと過酸化水素とイミダゾール類との反応により生ずる化学発光強度を測定するものとしている。

【0009】

また、この発明の体液中の過酸化水素測定法は、移動相流路へ体液を注入し、別の移動相流路よりイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液を注入して、これらの液をフローセル中のホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ固定化固相の充填部位で混合させて化学発光させ、その発光強度を化学発光測定装置により測定するものとしている。

【0010】

この発明の体液中の過酸化水素測定装置は、クロマトグラフィー用ポンプ11、オートサンプラー12を設けた体液の移動相流路F1と、クロマトグラフィー用ポンプ21を設けたイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液の移動相流路F2を合流させ、これら移動相流路の合流路F3をホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ固定化固相を充填したフローセル付き化学発光検出器31に接続し、さらにこの化学発光検出器31のフローセル32の前面に近接して、化学発光検出器31の光電子増倍管33を設置したものとしている。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、この発明の体液中の過酸化水素測定法およびその過酸化水素測定装置を詳細に説明する。

【0012】

先ず、この発明の体液中の過酸化水素測定法は、マイクロフローインジェクション化学発光システムを用いて、アルカリ環境下で固定化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（以下、HRPという）と過酸化水素とイミダゾール類との反応により生ずる化学発光強度を測定するものとしている。すなわち、過酸化水素測

定試料である体液をオートサンプラーから移動相流路へ注入し、別の移動相流路よりイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液を注入し、これら試薬をフローセルの中に送入し、フローセル中のH R P固定化固相の充填部位で自動混合させる。すると、H R P固定化固相の位置で化学発光が生じる。そこで、その発光強度を化学発光測定システムの光電子増倍管で測定する。そして、その測定データは、データ処理機で計算するものとしている。

【0013】

次に、この発明の体液中の過酸化水素測定装置は、図1に示したように、二台の高速液体クロマトグラフィー用ポンプ11、21、オートサンプラー12、フローセル付き化学発光検出器31およびデータ処理機41より構成されている。そして、前記クロマトグラフィー用ポンプ11、オートサンプラー12を設けた体液の移動相流路F1と、クロマトグラフィー用ポンプ21を設けたイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液の移動相流路F2を合流させ、これら移動相流路の合流路F3をH R P固定化固相を充填したフローセル付き化学発光検出器31に接続し、さらにこの化学発光検出器31のフローセル32の前面に近接して、化学発光検出器31の光電子増倍管33を設置したものとしている。そして、化学発光検出器31にはデータ処理機41を電気接続したものとしている。

【0014】

この発明における体液の種類としては、汗、涙、血液、尿の他に唾液、リンパ液などが用いられる。また、その体液の使用量は、5～50μL程度の少量でよい。

【0015】

この発明における体液の移動相流路、イミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液の移動相流路、これら移動相流路の合流路としては、ステンレス管、テフロンチューブなどが用いられ、これら移動相流路、合流路における流速は、100μL/m i n以下の低速度が好ましい。

【0016】

この発明におけるイミダゾール類としては、イミダゾール、2-メチルイミダゾール、4-メチルイミダゾール、4-メチル-5-ヒドロキシメチルイミダゾ

ール、アラントイン、エチレンウレア、ヒスチジン、ピラゾールなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、そのイミダゾール類の濃度は、100 mmol/L程度が好ましい。

【0017】

この発明におけるアルカリ性緩衝液としては、トリシン緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、そのアルカリ性緩衝液の濃度は、緩衝液の種類によって相違するが、トリシン緩衝液では50 mmol/Lとし、この場合のpH値は9.2であった。

【0018】

この発明におけるHRP固定化固相としては、キトサンゲル、ガラスビーズ、ポリスチレンゲル、アクリルゲルなどのアミノ基導入ゲルなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0019】

そして、この発明における試薬類の調製、HRPの固定化、フローセルの調製は、以下のようにして行った。

〔試薬類〕

- (1) HRP (EC1.11.1.7, 100 U/mL以上)、過酸化水素 (H₂O₂) およびイミダゾール (1,3-diaza-2,4-cyclopentadiene) は、和光純薬社製を用いた。
- (2) 水は、Milli-Q装置 (日本ミリポア社製) を用いて脱イオン精製した精製水を用いた。
- (3) 固定化固相として、キトパールビーズ (フジボー社製) およびアミノ基導入無孔性ガラスビーズ (ケムコ社製) 用いた。

〔HRPの固定化〕

HRP (15 mg/mL) をリン酸緩衝液 (0.1 mol/L, pH 6.5) に希釈して、中根法 (糖鎖酸化法) に従って固相に固定化した。

〔フローセル〕

テフロンチューブ (直径0.96 mm) へHRP固定化固相を長さ3 cmに渡って充填して、フローセルとした。

【0020】

この発明における高速液体クロマトグラフィー用ポンプとしては、例えば、日本分光社製のクロマトグラフィー用ポンプPU-980などを用いることができる。

【0021】

この発明におけるオートサンプラーとしては、例えば、日本分光社製のオートサンプラーAS-950などを用いることができる。

【0022】

この発明におけるフローセル付き化学発光検出器としては、例えば、日本分光社製の化学発光検出器823-CLなどを用いることができる。

【0023】

さらに、この発明におけるデータ処理機としては、例えば、日本分光社製のデータ処理機LCS-905などを用いることができる。

【0024】

次に、この発明における化学発光と、従来のルミノール化学発光およびロフイン化学発光とを比較検討した結果について説明する。

【0025】

先ず、この発明における化学発光の反応機構は、以下のように考えられる。すなわち、固定化HRPと過酸化水素とアルカリ性溶液中の溶存酸素が、イミダゾールを酸化し、イミダゾール過酸化物を生成する。このイミダゾール過酸化物はさらに酸化して、イミダゾールジオキセタンになり、そのイミダゾールジオキセタンが崩壊するときに発光を生ずると考えられる。

【0026】

この発明における過酸化水素より生ずる化学発光の強度は、ルミノール化学発光による過酸化水素より生ずる化学発光の強度と同等であった。すなわち、この発明における化学発光による過酸化水素(1.9、3.9、5.6、7.8、9.7 μ mol/L)の検量線の回帰式は、以下の通りであった。

$$Y = 9860X^2 + 3830X + 11700$$

(式中、Yは発光強度、Xは過酸化水素濃度 $\mu\text{mol/L}$)

この過酸化水素濃度域は、ルミノール化学発光での過酸化水素濃度域と同じで、また両者の過酸化水素最低検出域もほぼ同じであった（この発明における化学発光では $0.1\mu\text{mol/L}$ 、ルミノール化学発光では $0.2\mu\text{mol/L}$ ；いずれも $S/N=2$ 、 H_2O_2 量は $50\mu\text{L}$ ）。

【0027】

この発明における化学発光では、過酸化水素測定値の再現性が優れていた。すなわち、発光強度の同時再現性の検討では、過酸化水素 $9.7\mu\text{mol/L}$ で変動係数 0.3% 、 $4.9\mu\text{mol/L}$ で変動係数 0.4% 、 $2.4\mu\text{mol/L}$ で変動係数 0% （何れも $n=5$ ）であった。

【0028】

この発明における化学発光では、H R P 固定化固相の材質（キトサンビーズとガラスビーズを使用）は、化学発光に影響しなかった。しかし、キトサンビーズはガラスビーズよりH R P 結合量が多い点において優れていた。

【0029】

さらに、この発明における化学発光は、ルミノール化学発光と同等の感度を有しており、また水溶解性において優れていた。同様に過酸化水素測定においてロフイン化学発光より、水溶解性において優れていた。

【0030】

【発明の効果】

よって、この発明の体液中の過酸化水素測定法および過酸化水素測定装置は、臨床検査の分野における体液中の過酸化水素の定量測定において、非常に優れたものとなった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

この発明の体液中の過酸化水素測定装置の概略図である。

【符号の説明】

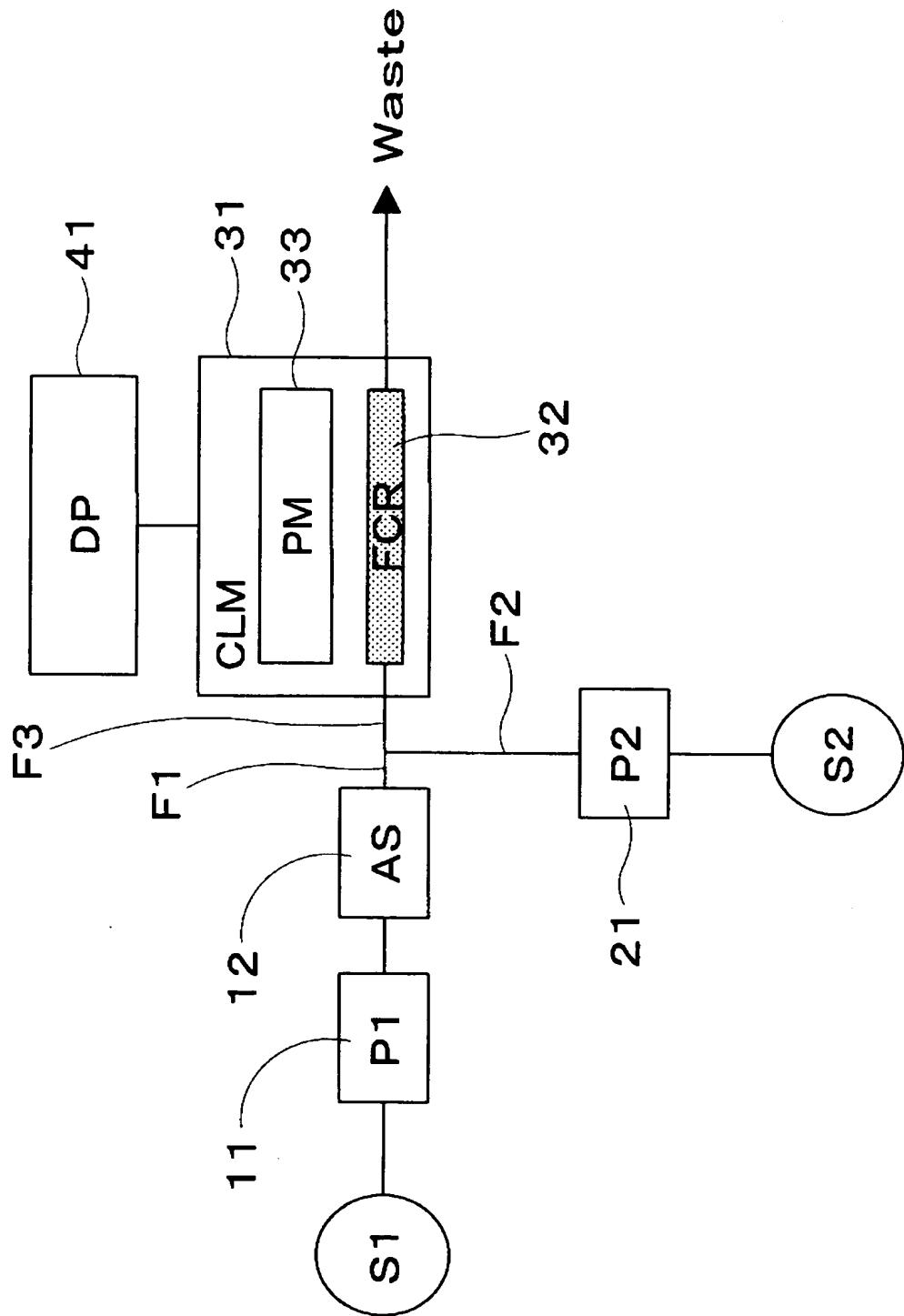
1 1 クロマトグラフィー用ポンプ

- 1 2 オートサンプラー
- 2 1 クロマトグラフィー用ポンプ
- 3 1 化学発光検出器
- 3 2 フローセル
- 3 3 光電子増倍管
- F 1 移動相流路
- F 2 移動相流路
- F 3 合流路

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 臨床検査の分野における体液中の過酸化水素の定量測定において、非常に優れた過酸化水素測定法および過酸化水素測定装置を提供する。

【解決手段】 この発明の過酸化水素測定法は、アルカリ環境下で固定化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼと過酸化水素とイミダゾール類との反応により生ずる化学発光強度を測定するものとしている。この発明の過酸化水素測定装置は、クロマトグラフィー用ポンプ11、オートサンプラー12を設けた体液の移動相流路F1と、クロマトグラフィー用ポンプ21を設けたイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液の移動相流路F2を合流させ、これら移動相流路の合流路F3をホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ固定化固相を充填したフローセル付き化学発光検出器31に接続し、さらにこの化学発光検出器31のフローセル32の前面に近接して、化学発光検出器31の光電子増倍管33を設置したものとしている。

【選択図】 図1

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 P020205-02

【提出日】 平成14年11月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-248766

【補正をする者】

【識別番号】 502313196

【氏名又は名称】 野崎 修

【補正をする者】

【識別番号】 502313200

【氏名又は名称】 河本 裕子

【補正をする者】

【識別番号】 396021896

【氏名又は名称】 株式会社ケムコ

【代理人】

【識別番号】 100072213

【弁理士】

【氏名又は名称】 辻本 一義

【プルーフの要否】 要

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】 1

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0004

【補正方法】 変更

【補正の内容】 2

【手続補正 3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0005

【補正方法】 変更

【補正の内容】 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アルカリ環境下で固定化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼと過酸化水素とイミダゾール類との反応により生ずる化学発光強度を測定することを特徴とする体液中の過酸化水素測定法。

【請求項 2】 移動相流路へ体液を注入し、別の移動相流路よりイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液を注入して、これらの液をフローセル中のホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ固定化固相の充填部位で混合させて化学発光させ、その発光強度を化学発光測定システムにより測定することを特徴とする体液中の過酸化水素測定法。

【請求項 3】 クロマトグラフィー用ポンプ（11）、オートサンプラー（12）を設けた体液の移動相流路（F1）と、クロマトグラフィー用ポンプ（21）を設けたイミダゾール類の溶液およびアルカリ性緩衝液の移動相流路（F2）を合流させ、これら移動相流路の合流路（F3）をホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ固定化固相を充填したフローセル付き化学発光検出器（31）に接続し、さらにこの化学発光検出器（31）のフローセル（32）の前面に近接して、化学発光検出器（31）の光電子増倍管（33）を設置したことを特徴とする体液中の過酸化水素測定装置。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来の過酸化水素の化学発光測定法や測定装置では、過酸化水素を含む化学発光試薬の迅速で効率の良い自動混合ができない、光電子倍増管などの光電子検出器に近接した位置で化学発光反応の開始および検出ができないなどの点で、測定精度の再現性の不良、有機溶媒の廃液の問題、検出感度の低下などにおいて不利、不便であるという課題を有していた。

【0005】

また、従来の過酸化水素の化学発光測定法に用いられる化学発光物質は、その化学発光検出に必須であるが、水に比較的難溶性であったり、不純物の混入があったり、調整試薬が保存中に劣化するなどの点で、不利、不便であるという課題を有していた。

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 P020205-02

【提出日】 平成15年 7月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-248766

【補正をする者】

【識別番号】 502313196

【氏名又は名称】 野崎 修

【補正をする者】

【識別番号】 502313200

【氏名又は名称】 河本 裕子

【補正をする者】

【識別番号】 396021896

【氏名又は名称】 株式会社ケムコ

【代理人】

【識別番号】 100072213

【弁理士】

【氏名又は名称】 辻本 一義

【プルーフの要否】 要

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪狭山市大野台1丁目29の4

【氏名】 野崎 修

【発明者】

【住所又は居所】 鳥取県米子市錦町1丁目209-3

【氏名】 河本 裕子

特願 2002-248766

出願人履歴情報

識別番号 [502313196]

1. 変更年月日 2002年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪狭山市大野台1丁目29の4
氏 名 野崎 修

特願2002-248766

出願人履歴情報

識別番号 [502313200]

1. 変更年月日 2002年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住所 鳥取県米子市錦町1丁目209-3
氏名 河本 裕子

特願2002-248766

出願人履歴情報

識別番号 [396021896]

1. 変更年月日 1996年 9月26日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府高槻市八幡町1番23号
氏名 株式会社ケムコ